

## High active alkaline phosphatase

Patent Number: EP0955369

Publication date: 1999-11-10

Inventor(s): BURTSCHER HELMUT DR (DE); MUELLER RAINER DR (DE); HOELKE WERNER DR (DE); MILLAN JOSE LUIS PROF (US)

Applicant(s):: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ EP0955369

Application Number: EP19990108502 19990430

Priority Number (s): DE19981019962 19980505

IPC Classification: C12N15/55 ; C12N9/16 ; C12N1/21 ; C12N5/10 ; C12N15/79

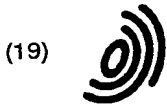
EC Classification: C12N9/16

Equivalents: AU2692699, ☐ DE19819962, ☐ JP11332586

### Abstract

DNA encoding a eukaryotic high active alkali phosphatase with a specific activity over 3000 U/mg where the amino acid at position 332 is smaller than aspartate is new. Independent claims are also included for: (1) a method to produce a DNA as above, characterized in that the mutated and wild type fragments of the cDNA of one or more alkali phosphatases are ligated into a single gene that encodes for an active alkali phosphatase; (2) a eukaryotic cDNA, that encodes a functional isoenzyme with alkali phosphatase activity and which is an intermediate product during the method of (1); (3) a vector containing a cDNA as above; (4) a eukaryotic or prokaryotic cell containing a vector as in (3); (5) a high active recombinant alkali phosphatase as above; (6) a method to produce a high active alkali phosphatase as above; and (7) a native high active alkali phosphatase having one of two 511 amino acid sequences (bIAP II or bIAP IV).

Data supplied from the esp@cenet database - I2



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 0 955 369 A2

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
10.11.1999 Patentblatt 1999/45

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/55, C12N 9/16,  
C12N 1/21, C12N 5/10,  
C12N 15/79

(21) Anmeldenummer: 99108502.8

(22) Anmeldetag: 30.04.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

- Müller, Rainer, Dr.  
82377 Penzberg (DE)
- Burtscher, Helmut, Dr.  
82392 Habach (DE)
- Millan, José Luis, Prof.  
San Diego, CA 92131-3505 (US)

(30) Priorität: 05.05.1998 DE 19819962

(71) Anmelder: Roche Diagnostics GmbH  
68298 Mannheim (DE)

Bemerkungen:

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen Angaben enthält.

(72) Erfinder:  
• Hoelke, Werner, Dr.  
82377 Penzberg (DE)

(54) **Hochaktive alkalische Phosphatase**

(57) Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend eine eukaryontische hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen DNA, sowie einen Vektor enthaltend die erfindungsgemäße DNA sowie eine Zelllinie enthaltend diesen Vektor. Die Erfindung betrifft weiterhin eine rekombinante hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg, die durch die erfindungsgemäße DNA kodiert wird.

EP 0 955 369 A2

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine DNA kodierend eine eukaryontische hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen DNA, sowie einen Vektor enthaltend die erfindungsgemäße DNA sowie eine Zelllinie enthaltend diesen Vektor. Die Erfindung betrifft weiterhin eine rekombinante hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg, die durch die erfindungsgemäße DNA kodiert wird.

[0002] Alkalische Phosphatasen (AP) sind dimere, zinkhaltige, nichtspezifische Phosphomonoesterasen, die in allen Organismen, von E.coli bis Säugern vorkommen (McComb et al., 1979). Der Vergleich der Primärstruktur verschiedener alkalischer Phosphatasen ergab einen hohen Homologiegrad (25-30% Homologie zw. E.coli- und Säuger-AP) (Millán, 1988; Harris, 1989).

[0003] Im Menschen und höheren Tieren besteht die AP-Familie aus vier Mitgliedern, die auf verschiedenen Genloci codiert sind (Millán, 1988; Harris 1989). Zur alkalischen Phosphatase-Familie zählen die gewebespezifischen APs (Placenta-AP (PLAP), Keimzellen-AP (GCAP) und Darm-AP (IAP)) und die nicht-gewebespezifischen APs (TNAP), die vorwiegend in Leber, Niere und Knochen lokalisiert sind.

[0004] Eine entscheidende Eigenschaft der bislang bekannten APs ist die große Variabilität in der katalytischen Aktivität der Säuger-APs, die eine 10-100 fach höhere spezifische Aktivität besitzen als die E.coli AP. Unter den Säuger-APs zeigt die AP aus dem Rinderdarm (bIAP) die höchste spezifische Aktivität. Diese Eigenschaft macht die bIAP attraktiv für biotechnologische Anwendungen wie Enzymkonjugate als diagnostisches Reagenz oder Dephosphorylierung von DNA. Besman und Coleman belegten 1985 die Existenz zweier IAP-Isoenzyme im Rinderdarm, die IAP aus dem Kälberdarm und die IAP aus dem Darm eines erwachsenen Rindes (bIAPs) durch aminoterminalen Ansequenzierung der chromatographisch aufgereinigten AP-Fractionen. Dabei wurde eine klare Unterscheidung am Aminoterminal zwischen der bIAP des erwachsenen Rindes (LVPVEEED) und der bIAP aus dem Kälberdarm (LIPAEEN) beschrieben. Weissig et al. gelang 1993 durch Klonierung eine genaue biochemische Charakterisierung einer rekombinanten bIAP (bIAP I) mit einer spezifischen Aktivität von ca. 3000 U/mg und dem N-Terminus LVPVEEED.

[0005] Es sind jedoch auch bIAPs aus Kälberdarm mit spezifischen Aktivitäten bis zu 8000 U/mg kommerziell erhältlich (Boehringer Mannheim, Biozyme, Oriental Yeast), die aber bislang nicht weiter charakterisiert waren. Sämtliche Versuche, diese hochaktiven alkalischen Phosphatasen zu klonieren, schlugen fehl. Die Herstellung einer rekombinanten, hochaktiven alkalischen Phosphatase war daher nicht möglich. Um jedoch eine wirtschaftliche Herstellung der hochaktiven alkalischen Phosphatase zu sichern, ist die rekombinante Herstellung zwingend erforderlich.

[0006] Demzufolge war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, hochaktive alkalische Phosphatasen rekombinant zur Verfügung zu stellen, die zudem klonierbar sind. Hochaktiv im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, daß die erfindungsgemäße alkalische Phosphatase eine um mindestens 10% gesteigerte Aktivität gegenüber vorbekannten alkalischen Phosphatasen aufweist.

[0007] Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung einer DNA kodierend eine eukaryontische hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg, bevorzugt mindestens 3500 U/mg, wobei der Aminosäurerest an der Position 322 kleiner ist als Aspartat. Bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine eukaryontische DNA. Besonders bevorzugt ist eukaryontische cDNA, das heißt eine DNA, die keine Introns mehr enthält. Unter dem Ausdruck "Aminosäurerest kleiner als Aspartat" ist jede Aminosäure, bevorzugt sind natürliche bzw. von diesen abgeleitete Aminosäuren, zu verstehen, die eine kleinere räumliche Ausdehnung als die Struktur der Aminosäure Aspartat aufweist. Bevorzugt ist die erfindungsgemäße DNA, bei der der Aminosäurerest 322 Glycin, Alanin, Threonin, Valin oder Serin ist. Besonders bevorzugt ist eine erfindungsgemäße DNA, bei der der Aminosäurerest 322 Glycin oder Serin ist. Ganz besonders bevorzugt ist, daß der Aminosäurerest 322 Glycin ist. Eine DNA gemäß SEQ ID No.: 1, 3 und 5 (Figur 1,3,5) und die zugehörige Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2,4 und 6 (Figur 2,4,6) sind Teil der vorliegenden Erfindung. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls solche cDNAs, die sich von den obengenannten nur darin unterscheiden, daß der N-Terminus länger oder kürzer ist im Vergleich zu den cDNAs gemäß SEQ ID No.: 2,4 und 6. Entsprechend verändert sich dann die Bezeichnung für die Position 322 gemäß SEQ ID No.: 2,4 und 6. Ist beispielsweise der N-Terminus um x Aminosäuren gegenüber der SEQ ID No.: 2,4 und 6 verlängert oder verkürzt, wird die relevante Position 322 ebenfalls um x Aminosäuren verschoben.

[0008] SEQ ID No.: 1 enthält den DNA-Code für die Sequenz des hochaktiven bIAP II-Isoenzyms. Das native Enzym war bekannt, jedoch nicht charakterisiert und nicht klonierbar. Somit ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Bestimmung der Aminosäuresequenz des hochaktiven bIAP II-Isoenzyms. Zur Sequenzbestimmung wurde eine hoch aufgereinigte Fraktion mit hoher spezifischer Aktivität aus dem Kälberdarm (Boehringer Mannheim) verwendet. Durch Spaltung mit den Endoproteinasen LysC, AspN, GluC, Trypsin sowie chemische Spaltung durch Bromcyan wurden peptide maps der hochaktiven AP erzeugt. Die so erzeugten Peptide wurden getrennt und mittels reversed phase HPLC isoliert. Über Elektrospray Massenspektroskopie wurde jedes Peptid analysiert und mittels Edman-Abbau sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit der veröffentlichten Sequenz der bIAP I (Weissig et al., 1993) verglichen. Wie erwartet besitzt der Aminoterminal von bIAP II die Startsequenz LIPAEEN, wie von Besman und

Coleman beschrieben (*J. Biol. Chem.* **260**, 11190-11193 (1985)). Die komplette Aminosäuresequenz der bIAP II ist gemäß SEQ ID No.: 2 (Figur 2) dargestellt. Danach weist die bIAP II insgesamt 24 Aminosäureaustausche zu bIAP I auf. Die Zahl der Aminosäuren beträgt im isolierten hochaktiven bIAP II Isoenzym 480 Aminosäuren. Die Nukleotidsequenz von 1798 bp (Figur 1) beinhaltet einen kodierenden Bereich von 514 Aminosäuren. Die von Position 481 bis einschließlich 514 möglichen Aminosäuren können dabei in weiten Grenzen variieren.

[0009] Die vorliegende Erfindung beschreibt das weitere die Klonierung und vollständige Charakterisierung von zwei neuen, bislang unbekannten bIAPs (bIAP III und bIAP IV). Von RNA-Proben aus verschiedenen Rinderdarmabschnitten wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Von den Proben mit dem stärksten Hybridisierungssignal wurde mit einem Oligo dT-primer (Stratagene, San Diego, CA, USA) eine cDNA-Bank im Vektor IZAP II (Stratagene, San Diego, CA, USA) angelegt. Die vollständige Bank ( $1,0 \times 10^6$  rekombinante Klone) wurde mit dem 1075 bp HindIII-Fragment von bIAP I, das einen Bereich von Exon I bis VIII des bIAP I-Gens abdeckt, gescreent. 65 Klone wurden isoliert und sequenziert. Dabei wurden zwei neue bIAPs identifiziert (bIAP III und bIAP IV), die weder zu bIAP I noch zu bIAP II, deren Charakterisierung weiter unten beschrieben ist, vollständig homolog waren. Die Nukleotidsequenzen von bIAP III und IV sind in Figur 3 und 5 abgebildet. Die Sequenzunterschiede der bIAPs I - IV sind in Figur 7 dargestellt. Keine der neuen bIAPs besitzt jedoch den erwarteten N-Terminus LIPAEEN, sondern neue, bislang noch nicht beschriebene N-Termini (s. Figur 7). Die cDNA der beiden neuen bIAP-Isoenzyme wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten und in den CHO-Expressionsvektor pcDNA-3 (z.B. der Fa. Invitrogen, San Diego, CA, USA) durch Ligation inseriert. Die Klone, die die neuen bIAP-Isoenzyme enthielten, wurden gemäß dem von Invitrogen beschriebenen Verfahren zur Expression gebracht und die Isoenzyme charakterisiert. In WO 93/18139 wird die Expression eines bIAP-Gens in verschiedenen Wirten beschrieben (CHO-Zellen, *E.coli*, Baculovirus-System). Die dort beschriebenen Verfahren, Vektoren und Expressionssysteme gehören zur Offenbarung der vorliegenden Anmeldung. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind des weiteren die nativen und rekombinanten hochaktiven alkalischen Phosphatasen bIAP III und bIAP IV. Besonders bevorzugt sind die alkalischen Phosphatasen gemäß SEQ ID No.: 4 und 6. CHO-Zelllinien enthaltend das bIAP III bzw. bIAP IV Gen wurden hinterlegt bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSM ACC 2349, DSM ACC 2350).

[0010] Des weiteren beschreibt die Erfindung die Konstruktion der bIAP II-Sequenz durch Ligation von mutierten- und Wildtyp-Fragmenten von bIAP I, III und IV. Durch diesen Prozeß wurden eine Reihe von intermediären Zwischenprodukten (L1N8, INT 1, INT 2 und INT3) generiert, die für funktionelle Isoenzyme codieren. Zur Konstruktion dieser intermediären Zwischenprodukte wurde jeweils ein Teilstück der zu verändernden bIAP-cDNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und durch ein die gewünschten Mutationen enthaltendes Teilstück einer anderen bIAP-cDNA, das durch Verdau mit Restriktionsenzymen kompatible Enden besitzt, ersetzt. Mutationen, die nicht durch Ligation von Teilstücken verschiedener bIAP-cDNAs eingeführt werden konnten, wurden via ortsgerichteter Mutagenese eingebracht. Das mutierte Fragment wurde anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten und in ein ebenfalls geschnittenes bIAP-cDNA Teilstück mit kompatiblen Enden ligiert (Figur 8). Die so eingeführten Mutationen wurden anschließend via Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

[0011] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen DNA, dadurch gekennzeichnet, daß mutierte und Wildtyp-Fragmente der DNA von einer oder mehreren alkalischen Phosphatasen ligiert wurden. Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine cDNA, die funktionelle Isoenzyme kodiert und die als Zwischenprodukte während des obengenannten erfindungsgemäßen Verfahrens entsteht. Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Vektor enthaltend die erfindungsgemäße cDNA.

[0012] Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine Zelllinie enthaltend den erfindungsgemäßen Vektor. Geeignete Zellen sind beispielsweise eukaryontische Zellen wie CHO, Pichia, Hansenula oder Saccharomyces cerevisiae und Aspergillus oder prokaryontische Zellen, wie *E. coli*. Besonders bevorzugt sind *E. coli*, Hefe- und CHO-Zellen. Geeignete Ausgangsvektoren für *E.coli*-Stämme sind beispielsweise pTE, pTaq, pPL, pBluescript. Als *E. coli*-Stämme kommen beispielsweise XL1-Blue, HB 101, RR1  $\Delta$  M15, BL 21 (DE), MC 1000 etc. in Frage. Geeignete Pichia Vektoren sind beispielsweise pGAPZ $\alpha$  und pPICZ $\alpha$  (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Ein geeigneter Vektor für CHO-Zelllinien ist beispielsweise pcDNA-3 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Eine CHO-Zelllinie enthaltend das bIAP II Gen wurde hinterlegt bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig (DSM ACC 2348).

[0013] Die kinetische Charakterisierung der rekombinanten bIAP I, II, III und IV-Isoenzyme ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften (Figur 9). bIAP II zeigt beispielsweise eine um über 300% gesteigerte, d.h. über dreifach höhere spezifische Aktivität (ca. 8600 U/mg) als bIAP I (ca. 2700 U/mg). Aber auch bIAP III und bIAP IV zeigen eine etwa 1,8fach (ca. 4700 U/mg) bzw. etwa 2,6fach (>6700 U/mg) höhere Aktivität als bIAP I (Figur 9), was einer prozentualen Steigerung von ca. 170% bzw. 250% entspricht. Zudem war ein beträchtlicher Unterschied der Isoenzyme bezüglich der Stabilität gegenüber Hitze meßbar. bIAP I ist das hitzestabilste Isoenzym, der  $T_m$ -Wert von bIAP II und III liegt 7°C niedriger und der  $T_m$ -Wert von bIAP IV 13°C niedriger als bIAP I (Figur 9). Unter dem  $T_m$ -Wert ist der Temperaturwert zu verstehen, bei dem 50% Restaktivität nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten

gemessen wird.

[0014] Des weiteren beschreibt die Erfindung die Identifikation der Aminosäurereste, die Einfluß auf die spezifische Aktivität der bIAPs besitzen. Dabei waren die intermediären Zwischenprodukte hilfreich. Die Expression der intermediären Chimären L1N8, INT 1, INT 2 und INT 3 ermöglichten es, bereits 11 der 24 Aminosäuren als Effektor für die Aktivitätserhöhung auszuschließen (Figur 7).

- Das L1N8-Mutantenenzym zeigte eine vergleichbare spezifische Aktivität wie bIAP I, demnach sind die hier eingeführten Mutationen V2I, V4A und D8N für die Erhöhung der spezifischen Aktivität nicht relevant. Die Bezeichnung V2I bedeutet, daß in Position 2 die Aminosäure Valin gegen Isoleucin ersetzt wird.
- Die INT 1-Mutante besitzt eine vergleichbare spezifische Aktivität mit bIAP II, demzufolge ist dieser Bereich entscheidend.
- Die INT 2-Mutante besitzt eine vergleichbare spezifische Aktivität wie INT 1 und bIAP II, demzufolge können die Mutationen S380G, D411G, D416E, Q420R, Q427L, E453Q und T480A aus INT 2 ebenfalls ausgeschlossen werden.
- Bei der Generierung der INT 3-Mutante konnte ebenfalls keine Änderung der hohen spezifischen Aktivität festgestellt werden, somit ist ein Effekt der Mutation N192Y auszuschließen.

[0015] Zur Identifikation, welche der 13 verbliebenen Reste entscheidend für die hohe spezifische Aktivität ist, wurde in der vorliegenden Erfindung die bIAP II-cDNA als Template für Einzelmutationen gegen die entsprechende Aminosäure von bIAP I verwendet. Es wurden die Einzelmutanten N122K, I133M, A142S, K180M, M205K, E210V, E236A, G322D, und I332G sowie eine kombinierte A289Q-A294V-Q297R-L299V-bIAP II-Mutante erstellt (Figur 9).

[0016] Überraschenderweise konnte hierbei festgestellt werden, daß hauptsächlich die Mutation G322D in der Lage ist, die hohe spezifische Aktivität von bIAP II (ca. 8600 U/mg) um mehr als den Faktor 3 zu senken (2817 U/mg) und somit in die vergleichbar niedrige spezifische Aktivität der bIAP I umzuwandeln.

[0017] Zur Verifikation dieses Ergebnisses wurde in der vorliegenden Erfindung die umgekehrte Mutation D322G in bIAP I eingeführt. Überraschenderweise konnte hier der umgekehrte Effekt, nämlich ein Anstieg der spezifischen Aktivität um mehr als Faktor 3 auf 10148 U/mg gemessen werden und somit ein vergleichbarer Wert mit bIAP II erzielt werden (Figur 9). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der relativ höheraktiven bIAP III (ca. 4700 U/mg) und der höheraktiven bIAP IV (>6700 U/mg) bestätigt dieses Ergebnis nochmals. bIAP III besitzt in Position 322 ein Serin, bIAP IV wiederum ein Glycin.

[0018] Des weiteren wurden in der vorliegenden Erfindung die erzeugten Mutanten wiederum auf Stabilität gegenüber Hitze untersucht. Demzufolge ist der Unterschied in der Hitzestabilität zwischen bIAP I und bIAP II auf einen Kombinationseffekt von mehr als einem Austausch zurückzuführen. Sowohl die [G<sup>322</sup>]bIAP I- wie auch die [D<sup>322</sup>]bIAP II-Mutante zeigen Stabilitätswerte, die zwischen denen der bIAP I- und bIAP II-Isoenzyme liegen (Figur 9). Die D322G-Mutation hat einen geringen destabilisierenden Effekt (annähernd 4°C in T<sub>50</sub>) auf das bIAP I-Isozym, während die Substitution G322D in bIAP II eine entsprechende Erhöhung der Stabilität dieses Mutantenenzymes zufolge hat. Jedoch wird die Stabilität gegenüber Hitze der Wildtyp-bIAP I nicht erreicht.

[0019] Somit besteht der Gegenstand der vorliegenden Erfindung insbesondere darin, eine hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase mit einer Aktivität über 3000 U/mg zur Verfügung zu stellen, die durch eine eukaryontische cDNA kodiert wird. Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase, wobei an der Position 322 ein Glycin, Alanin, Threonin, Valin oder Serin ist. Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße alkalische Phosphatase, wobei an der Position 322 ein Glycin ist.

[0020] Die erfindungsgemäße hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase kann bevorzugt zusätzlich an einer oder mehreren der folgenden Positionen eine Mutation aufweisen:

[0021] Aminosäurereste in Position 1, 108, 125, 149, 181, 188, 219, 221, 222, 223, 224, 231, 252, 258, 260, 282, 304, 321, 330, 331, 354, 383, 385, 400, 405, 413, 428, 431 und 461, wobei durch die Mutation eine Aktivitätssteigerung bewirkt wird. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist des weiteren ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen hochaktiven alkalischen Phosphatase. Die erfindungsgemäßen alkalischen Phosphatasen können durch gezielte Mutagenese auch weiter verbessert werden, z.B. hinsichtlich ihrer Thermostabilität.

[0022] Die Aktivität der erfindungsgemäßen hochaktiven alkalischen Phosphatase wurde nach E. Mössner et al., Z. Physiol. Chem. 361 (1980), 543-549 bestimmt; mit dem Unterschied, daß der Test nicht, wie in der Publikation beschrieben, bei 25°C, sondern bei 37°C durchgeführt wurde. Die Bestimmung bei 37°C ist die weltweit übliche Temperatur, bei der die Aktivität im Diethanol-puffer (BM Test Method 5426) gemessen wird.

[0023] Die Proteinbestimmung der erfindungsgemäßen und bekannten APs erfolgte durch Messen der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm gegen Wasser. Die Extinktion einer nieder und hochaktiven AP-Lösung mit einer Konzen-

## EP 0 955 369 A2

tration von 1 mg/ml ist bei 280 nm 1,0 (A 280 nm (1 mg/ml) gleich 1).

[0024] Die spezifische Aktivität wird durch Verhältnisbildung von Aktivität mit der zugehörigen Proteinmenge ermittelt.

### Erläuterung der Figuren

[0025]

#### Figur 1:

SEQ ID No.: 1 Nukleotidsequenz von bIAP II (1798 bp)

Start des kodierenden Bereiches für die reife bIAP II in Pos 108, Ende in Pos 1649

#### Figur 2:

SEQ ID No.: 2 Aminosäuresequenz von bIAP II (480 Aminosäuren) mit Spaltstellen

#### Figur 3:

SEQ ID No.: 3 Nukleotidsequenz von bIAP III (2460 bp)

Start des kodierenden Bereiches für die reife bIAP III in Pos 123, Ende in Pos 1655

#### Figur 4:

SEQ ID No.: 4 Aminosäuresequenz von bIAP III (511 Aminosäuren)

#### Figur 5:

SEQ ID No.: 5 Nukleotidsequenz von bIAP IV (2542 bp)

Start des kodierenden Bereiches für die reife bIAP IV in Pos 122, Ende in Pos 1654

#### Figur 6:

SEQ ID No.: 6 Aminosäuresequenz von bIAP IV (511 Aminosäuren)

#### Figur 7:

Aminosäureunterschiede zwischen bIAP I, bIAP II, bIAP III und bIAP IV Isoenzymen

Lediglich die unterschiedlichen Reste werden gezeigt. Mit einem Stern werden solche Positionen identifiziert, die zur individuellen Mutagenese ausgewählt wurden, um die Reste zu identifizieren, die für die erhöhte katalytische Aktivität der bIAP II verantwortlich sind.

#### Figur 8:

Ligationsstrategie für die bIAP II - DNA

#### Figur 9:

Kinetische Parameter und Hitzestabilität der rekombinanten Wildtyp, chimären und durch ortsgerichtete Mutagenese veränderten Mutanten der bIAP Enzyme.

\* [QVRV]bIAP II ist die Abkürzung für die [Q<sup>289</sup>, V<sup>294</sup>, R<sup>297</sup>, V<sup>299</sup>]bIAP II Mutante.

[0026] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

### Beispiel 1: Klonierung

[0027] Eine  $\lambda$ gt 11 cDNA Bank präpariert aus Darm von erwachsenen Rindern (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) wurde unter Verwendung eines 1075 bp Hind III Fragments vom 5' Ende der bIAP I cDNA (Weissig et al., 1993) als Sonde gescreent. Klone aus dieser cDNA Bank wurden zum Screenen einer EMBL-3 SP6/T7 genomischen cDNA Bank verwendet, die aus der Leber von erwachsenen Rindern hergestellt war (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). Eine nicht amplifizierte  $\lambda$ ZAP II cDNA Bank wurde mittels eines Oligo dT - primers (Stratagene, San Diego, CA, USA) aus mRNA angelegt, die unter Verwendung des Trisolv<sup>TM</sup> Reagenz aus dem Dünndarm eines erwachsenen Rindes isoliert und mit dem 1075 bp Hind III Fragment der bIAP I cDNA als Sonde gescreent wurde. Die Proben wurden unter Verwenden eines random primed DNA labeling kit radiomarkiert (Boehringer Mannheim). Phagen DNA wurde wie beschrieben für  $\lambda$ gt 11 und EMBL-3 SP6/T7 Klone hergestellt (Tsonis & Manes, 1988). Das in vivo Schneiden der  $\lambda$ ZAP II Klone wurde nach der Anweisung des Herstellers durchgeführt (Stratagene, San Diego, CA). Genomische Klone wurden mit Southern blot Analyse, wie beschrieben, charakterisiert (Sambrook et al., 1989). EcoRI cDNA Fragmente von  $\lambda$ gt 11 Klonen und unterschiedliche Restriktionsfragmente aus Klonen anderer Banken wurden in den KS+

-Vektor (Stratagene, San Diego, CA, USA) subkloniert. Plasmid DNA wurde durch alkalische Lyse hergestellt (Sambrook et al., 1989). Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Sequenase gemäß Herstellerprotokoll (Amersham). Die für die Sequenzierung von bIAPs III und IV verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend beschrieben. 1s: SEQ ID No. 7: GCC AAG AAT GTC ATC CTC; 1a: SEQ ID No. 8: GAG GAT GAC ATT CTT GGC; 2s: SEQ ID No. 9: GGT GTA AGT GCA GCC GC; 2a: SEQ ID No. 10: GCG GCT GCA CTT AGA CC; 3s: SEQ ID No. 11: AAT GTA CAT GTT TCC TG; 3a: SEQ ID No. 12: CAG GAA ACA TGT ACA TT; 4s: SEQ ID No. 13: CCA GGG CTT CTA CCT CTT; 4a: SEQ ID No. 14: AAG AGG TAG AAG CCC TGG; 5s: SEQ ID No. 15: ACC AGA GCT ACC ACC TCG; 5a: SEQ ID No. 16: AAG CAG GAA ACC CCA AGA; 6s: SEQ ID No. 17: CTT CAG TGG CTT GGG ATT; 6a: SEQ ID No. 18: AAT CCC AAG CCA CTG AAG. Die Nukleinsäuresequenzen wurden mit dem MacVector Sequenzanalysen-Programm analysiert (International Biotechnologies, Inc. New Haven, CT, USA).

#### Beispiel 2: Bestimmung der Aminosäuresequenz von bIAP II

[0028] Ungefähr 500 µg einer gereinigten, hochaktiven (ca. 6000 U/mg) Rinderdarm AP wurde in 450 µl 6M Guanidinhydrochlorid, 0.25 M Tris, 1mM EDTA, pH 8.5 gelöst und anschließend 30 µl Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach Reduktion in 30 Minuten bei 100°C wurden die Cysteine durch Zugabe von 35 µl Vinylpyridin alkyliert und diese Mischung 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann sofort über eine kurze Reversed phase HPLC Aquapore RP300 column entsalzt (30 x 2.1 mm, Applied Biosystems, Weiterstadt). Ein Stufengradient von Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure wurde verwendet, um gebundene Enzyme zu eluieren. Protein enthaltende Fraktionen wurden bis zur Trockne eingedampft. Um das Enzym zu deglykosilieren, wurden 125 µg AP in 15 µl destilliertem Wasser und 6 µl Inkubationspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM EDTA, pH 7.2) und 15 U EndoF/PNGase gelöst (Boehringer Mannheim, Penzberg). Die Mischung wurde über Nacht bei 37°C gehalten und anschließend zur Spaltung verwendet. Reduzierte und alkylierte AP wurde mit verschiedenen Enzymen gemäß den Anweisungen auf den Datenblättern der einzelnen Enzyme enzymatisch gespalten (Endoproteinase LysC, Endoproteinase AspN, Endoproteinase GluC und Trypsin (Boehringer Mannheim, Penzberg). Cyanbromid Spaltung wurde mit 10% (w/w) CNBr in 70% (v/v) Ameisensäure über 8 Stunden durchgeführt. Nach Lösen mit Wasser wurde die Lösung mit einem SpeedVac Konzentrator (Savant) im Volumen reduziert und für eine Reversed phase HPLC verwendet. Der Verdau des C-terminalen tryptischen Peptids wurde über 4 Minuten mit Carboxypeptidase Y (8 ng/µl) durchgeführt und die freigesetzten Peptide mit einer Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisationsmassenspektrometrie über ein Bruker Reflex III Gerät gemäß Anweisung des Herstellers analysiert. 2,5 Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml) in Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) wurde als Matrix verwendet. Peptide aus enzymatischen oder chemischen Spaltungen wurden mit Reversed phase HPLC auf einer LiChrospher C18 selB Säule 125x2 mm (Merck, Darmstadt) unter Einsatz eines 0.1% Trifluoressigsäure/Acetonitril Lösungsmittelsystems getrennt. Die Flußrate betrug 300 µl/min. Der Auslauf wurde mit UV Monitor bei 206 nm detektiert und die Fraktionen manuell gesammelt. Die Massenbestimmung der Peptide wurde mit einem API III Elektrospray Massenspektrometer (PE-Sciex, Langen) nach den Anweisungen des Herstellers ausgeführt. Die Aminosäuresequenz wurde mit einem 492A Proteinsequenzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) gemäß den Herstelleranweisungen ermittelt.

#### Beispiel 3: Herstellung der bIAP II cDNA und bIAP II Mutagenese

[0029] Zur Herstellung einer cDNA, die für bIAP II codiert, wurden Wildtyp Restriktionsfragmente und ortsgerichtet mutagenisierte PCR Fragmente von den cDNAs bIAP I, III und IV miteinander ligiert und die L1N8 (3 Fragmente) and INT 1 (9 Fragmente) cDNA Zwischenkonstrukte geschaffen. INT 1 und bIAP III dienten dann als Vorlage für die ortsgerichtete Mutagenese und Fragmente hieraus wurden zu der kompletten INT 2 (8 Fragmente) cDNA zusammengesetzt. Restriktionsfragmente von INT 2 und ortsgerichtet mutagenisierte Fragmente von INT 2 wurden dann zu der INT 3 (5 Fragmente) cDNA und schließlich zur bIAP II (4 Fragmente) cDNA zusammengesetzt. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach der Methode von Tomic et al. (1990) durchgeführt, wobei Bsa I (Typ II s) als Restriktionsenzym verwendet wurde, welches in einem Abstand von seiner Erkennungssequenz schneidet (GGTCTCN1/N5). Alle PCR-Produkte wurden sequenziert, um die Abwesenheit von Sekundär-Mutationen zu verifizieren. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Restriktionsverdau bestätigt. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-primers zur Amplifikation der ortsgerichteten, mutagenisierten Fragmente sind wie folgt: der Name des primers wird zuerst genannt, gefolgt von der Sequenz (Positionen, die die Mutation anzeigen, sind unterstrichen): KS: SEQ ID No. 19: CGA GGT CGA CGG TAT CG; 1L: SEQ ID No. 20: GCA GGT CTC TCA GCT GGG ATG AGG GTG AGG; 8N: SEQ ID No. 21: GCA GGT CTC AGC TGA GGA GGA AAA CCC CGC; 122: SEQ ID No. 22: GCA GGT CTC TGT TGT GTC GCA CTG GTT; 1s: SEQ ID No. 7: GCC AAG AAT GTC ATC CTC; M133f: SEQ ID No. 23: GGT CTC TTT CTT GGC CCG GTT CAT CAC; S142A: SEQ ID No. 24: GGT CTC AAG AAA GCA GGG AAG GCC GTC; 180: SEQ ID No. 25: GGT CTC GTG CAT CAG CAG GCA GGT CGG C; M180K: SEQ ID No. 26: GGT CTC ATG CAC AGA AGA ATG GCT GCC AG; K205M: SEQ ID No. 27: GGT CTC AAA CAT GTA CAT TCG GCC TCC ACC; V210E: SEQ ID No. 28: GT CTC CAT GTT TCC TGA GGG

GAC CCC A; A236E: SEQ ID No. 29: GGT CTC CTG CCA T~~T~~C CTG CAC CAG GTT; 236: SEQ ID No. 30: GGT CTC TGG CAG GCC AAG CAC CAG GGA; 289: SEQ ID No. 31: GGT CTC CAG GGT CGG GTC CTT GGT GTG; E289A: SEQ ID No. 32: GGT CTC GAC CCT GGC GGA GAT GAC G; 330: SEQ ID No. 33: GGT CTC CTC AGT CAG TGC CAT ATA; 330E, V332I: SEQ ID No. 34: GGT CTC ACT GAG GCG ATC ATG TTT GAC; Xla: SEQ ID No. 35: TG CAC CAG GTG CGC CTG CGG GCC; N192Y: SEQ ID No. 36: GCC GCA CAG CTG GTC TAC AAC ATG GAT; S380G: SEQ ID No. 37: GCT GTC TAA GGC CTT G~~C~~C GGG GGC; N192Y: SEQ ID No. 38: GCC GCA CAG CTG GTC TAC AAC ATG GAT; D411G: SEQ ID No. 39: GGG GGT CTC GCT TGC TGC CAT TAA C; D416E: SEQ ID No. 40: GTT AAT GGT CTC ACA AGC GAG GAA CCC TCG; S428A: SEQ ID No. 41: CCC GTG GGT CTC GCT AGC CAG GGG CAC; D416E: SEQ ID No. 42: GTT AAT GGT CTC ACA AGC GAG GAA CCC TCG; T480S: SEQ ID No. 43: GAT GCT GGT CTC GGT GGA GGG GGC TGG CAG; 480: SEQ ID No. 44: CTG CCA GGT CTC ACC ACC GCC ACC AGC ATC; SP6: SEQ ID No. 45: CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG; 236: SEQ ID No. 46: GGT CTC TGG CAG GCC AAG CAC CAG GGA; Q304R-: SEQ ID No. 47: GTA GAA GCC CCG GGG GTT CCT GCT; Q304+: SEQ ID No. 48: AGC AGG AAC CCC CGG GGC TTG TAC; E321D: SEQ ID No. 49: TGC CAT ATA AGC TTT GCC GTC ATG GTG. Die verschiedenen PCR - Reaktionen sind von 1 - 16 nummeriert, die Vorlagen sind entweder Wildtyp cDNAs bIAP I, III oder IV, oder die chimären Konstrukte INT 1 oder INT 2. Die Oligonukleotid primer (in Klammern) sind die oben angegebenen. 1. bIAP IV (KS, 1L); 2. bIAP IV (8N, 122); 3. bIAP III (1S, M133I); 4. bIAP I (S142A, 180); 5. bIAP I (M180K, K205M); 6. bIAP I (V210E, A236E); 7. bIAP I (236, 289); 8. bIAP IV (E289A, 330); 9. bIAP III (330E, V332I, Xla); 10. INT1 (N192Y, S380G); 11. INT1 (N192Y, D411G); 12. bIAP III (D416E, S428A); 13. INT1 (D416E, T480S); 14. INT1 (480, SP6); 15. INT2 (236, Q304R-); 16. INT2 (Q304R+, E321D). Die folgenden Ligationsreaktionen wurden in allen Fällen unter Verwendung des pcDNA-3 (Invitrogen, San Diego, CA) Expressionsvektors durchgeführt. Die Fragmente sind gemäß der oben genannten PCR Reaktionsnummer beziffert oder mit dem Namen des Wildtyps oder der chimären cDNA benannt, gefolgt von den Restriktionsenzymen, die zur Bildung des kohäsiven Terminus dieses Fragments benutzt werden. L1N8 = pcDNA-3/EcoRI-XbaI + 1/EcoRI-BsaI + 2/BsaI-BamHI + bIAP I/BamHI-XbaI. INT 1 = pcDNA-3/EcoRI-XbaI + L1N8/EcoRI-NcoI + 3/NcoI-BsaI + 4/BsaI + 5/BsaI + 6/BsaI + 7/BsaI + 8/BsaI + 9/BsaI-StuI + bIAP I/StuI-XbaI. INT 2 = pcDNA-3/EcoRI-NotI + INT1/EcoRI-PstI + 10/PstI-StuI + 11/StuI-BsaI + 12/BsaI + 13/BsaI + 14/BsaI + bIAP I/BsaI-NotI. INT 3 = pcDNA-3/EcoRI-XbaI + INT2/EcoRI-NcoI + INT2/NcoI-PvuII + 10/PvuII-EagI + INT2/EagI-HindIII + INT2/HindIII-XbaI. bIAP II = pcDNA-3/EcoRI-XbaI + INT3/EcoRI-EagI + 15/EagI-SmaI + 16/SmaI-HindIII + INT3/HindIII-XbaI.

[0030] 10 zusätzliche Konstrukte wurden hergestellt, um den Rest (die Reste) zu identifizieren, die für die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften von bIAP I und II verantwortlich sind. Alle Konstrukte wurden in pcDNA-3/EcoRI-XbaI subcloniert. 5 Konstrukte wurden durch den Austausch von Restriktionsfragmenten zwischen L1N8 oder bIAP I (I) und bIAP II (II) hergestellt. L1N8 EcoRI-PmlI und (II) PmlI-XbaI wurden ligiert, um die [N122K]bIAP II Mutante cDNA herzustellen. (II) EcoRI-BstEII, (I) BstEII-PvuII, (II) PvuII XbaI wurden für die [K180M]bIAP II Mutante cDNA kombiniert. (II) EcoRI-EagI, (I) EagI-BstEII, (II) BstEII-XbaI wurden für die [A289Q, A294V, Q297R, L299V]bIAP II Mutante ligiert. (II) EcoRI-EagI, (II) EagI-BstEII, (I) BstEII-HindIII, (II) HindIII-XbaI fuer die [G322D]bIAP II Mutante. (II) EcoRI-HindIII, (I) HindIII-SacI, (II) SacI-XbaI fuer die [I332G]bIAP II Mutante. 5 andere Positionen erforderten neue ortsgerechte Mutagenese. Hierfür wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet: I133M-: SEQ ID No. 50: GGT CTC TTT CTT GGC CCG GTT CAT CAC; A142S-: SEQ ID No. 51: TGG TCA CCA CTC CCA CGG ACT TCC CTG; M205K-: SEQ ID No. 52: GGT CTC AAA CAT GTA TTT TCG GCC TCC ACC; E210V+: SEQ ID No. 53: GGT CTC ATG TTT CCT GTG GGG ACC CCA GAC; E236A: SEQ ID No. 54: GGT CTC CTG CCA TGC CTG CAC CAG GTT. Unter Verwendung dieser und der vorher aufgelisteten Oligonukleotide wurden die folgenden 8 PCR Reaktionen (a-h) mit bIAP II als Vorlage durchgeführt: a. 1s, I133M-; b. S142A+, M205K-; c. 1s, A142S-; d. V210E+, 330-; e. E210V+, 330-; f. M180K+, E236A-; g. 236+, 330-; h. S142A, K205M-. Die hieraus entstandenen Produkte wurden subcloniert und sequenziert und dann Fragmente für die folgenden Ligationen isoliert: (II) EcoRI-NcoI, (a) NcoI-BsaI, (b) BsaI, PvuII, (II) PvuII-XbaI fuer I133M. (II) EcoRI-NcoI, (c) NcoI-BstEII, (II) BstEII-PvuII, (II) PvuII-XbaI fuer A142S. (II) EcoRI- BstEII, (b) BstEII-BsaI, (d) BsaI-HindIII, (II) HindIII-XbaI fuer M205K. (II) EcoRI-BstEII, (h) BstEII- BsaI, (e) BsaI-HindIII, (II) HindIII-XbaI fuer E210V. (II) EcoRI-NcoI, (II) NcoI-PvuII, (f) PvuII-BsaI, (g) BsaI-HindIII, (II) HindIII-XbaI fuer E236A.

#### Beispiel 4: Produktion und Charakterisierung von rekombinanten Enzymen

[0031] Alle cDNAs (bIAP I, bIAP II, bIAP III, bIAP IV und entsprechende Mutanten) wurden in den pcDNA-3 Expressionsvektor kloniert (Invitrogen, San Diego, CA, USA), in Eierstockzellen eines chinesischen Hamsters (CHO Zellen) übertragen und stabile Transfektanten durch Wachsen der Zellen in Gegenwart von 500 µg/ml Geneticin ausgewählt (Gibco, BRL). Recombinante APs wurden aus stabilen übertragenen CHO Zellen wie beschrieben extrahiert (Hoyle et al., 1997). Zur Messung von  $k_{cat}$  wurden Mikrotiterplatten, die mit 0.1 µg/ml hochaffinem Anti-Rinder AP monoklonalem Antikörper beschichtet waren (Scottish Antibody Production Unit, Lanarkshire, Scotland), mit zunehmenden Enzymkonzentrationen inkubiert. Die Aktivität des gebundenen Enzyms wurde als zeitliche Änderung der Absorption bei 405 nm und 20°C nach Hinzufügen von 30 mM p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat in 1.0 M Diethanolamin



## EP 0 955 369 A2

Puffer (pH 9.8), 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  gemessen. Die gebildete p-Nitrophenol Konzentration wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von  $10,080 \text{ liter mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  errechnet. Handelspräparate mit bekannten spezifischen Aktivitäten (Biozyme Laboratories, 7822 U/mg und Boehringer Mannheim, 3073 U/mg) als auch aufgereinigte bIAP II (8600 U/mg) wurden als Standards verwendet. Die Enzymkonzentration in diesen Lösungen, die den Antikörper absättigten ( $E^\circ$ ), wurde aus einer Standardkurve Aktivität gegenüber bekannten Enzymkonzentrationen unter identischen Testbedingungen berechnet. Die maximale Substratumsetzung ( $V_{\text{max}}$ ) wurde dann durch  $E^\circ$  geteilt, um  $k_{\text{cat}}$  zu errechnen. Zur Berechnung von  $K_m$  wurde die Substratkonzentration zwischen 0.25 - 2.0 mM p-Nitrophenylphosphat (pNPP) verändert und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei 20°C in einem Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Regressionskurven von  $[\text{pNPP}]/v$  gegen  $[\text{pNPP}]$  (Hanes Kurven) zur x-Achse ergaben  $-K_m$ . Teilen der Standardabweichung des berechneten y-Wertes für jeden x-Wert in der Regression durch die Regressionsneigung ergab die Standardabweichung von  $K_m$ .  $V_{\text{max}} \pm$  Standardabweichung wurde unter Verwendung der zugehörigen Gleichungen durch Teilen von  $K_m \pm$  Standardabweichung mit dem y-Achsenabschnitt  $\pm$  Standardabweichung berechnet. Die spezifischen Aktivitäten wurden auf der Basis Antikörper-gesättigte Aktivität im Vergleich zu Biozyme errechnet. Hitzestabilitätskurven wurden durch Inkubation von Extrakten bei 45 - 75 °C erstellt, Zunahme in 5 °C Schritten je 10 Minuten, wie vorher beschrieben (Weissig et al., 1993). Die Aktivität jeder Probe wurde dann wie oben bestimmt und die Restaktivität als verbleibender Prozentanteil, verglichen mit der nicht erhitzten Probe, berechnet. Die Temperatur, bei der 50% Restaktivität übrigbleibt ( $T_{50}$ ), wurde aus der Restaktivität gegenüber den Temperaturkurven errechnet.

# EP 0 955 369 A2

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Hochaktive alkalische Phosphatase

<130> 489300ep

10 <140> 99108502.8-2105

<141> 1999-04-30

<160> 54

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1798

<212> DNA

<213> Bovine intestinal

<400> 1

25 gaattcggca cgagccaggt cccatcctga ccctccgcca tcacacagct atgcagtggg 60

cctgtgtgct gctgctgctg ggcctgtggc tacagctctc cctcaccctc atcccagctg 120

aggaggaaaa ccccgccctc tggaaccgcc aggcagccca ggcccttgat gtagccaaga 180

agttgcagcc gatccagaca gctgccaaaga atgtcatcct ctctctgggg gatgggatgg 240

gggtgcctac ggtgacagcc actcggatcc taaaggggca gatgaatggc aaactgggac 300

30 ctgagacacc cctggccatg gaccagtcc catacgtggc tctgtccaag acatacaacg 360

tggaacagaca ggtgccagac agcgcaggca ctgccactgc ctacctgtgt ggggtcaagg 420

gcaactacag aaccatcggg gtaagtgcag ccgcccgtca caatcagtgc aacacgacac 480

gtgggaatga ggtcacgtct gtgatcaacc gggccaagaa agcaggggaag gccgtgggag 540

tggtgaccac caccagggtg cagcatgcct ccccagccgg ggccctacgcg cacacgggtg 600

35 accgaaactg gtactcagac gccgacctgc ctgctgatgc acagaagaat ggctgccagg 660

acatcgccgc acagctgggc tacaacatgg atattgacgt gatcctgggt ggaggccgaa 720

tgtacatggt tcttgagggg accccagacc ctgaataccc agatgatgcc agtgtgaatg 780

gagtccggaa ggacaagcag aacctgggtc aggaatggca ggccaagcac caggggagccc 840

40 agtatgtgtg gaaccgcaact gcgctccttc aggcggccga tgactccagt gtaacacacc 900

tcatgggcct ctttgagccg gcagacatga agtataatgt tcagcaagac cacaccaagg 960

acccgacctt ggccggagatg acggaggcgg ccctgcaagt gctgagcagg aacccccggg 1020

gcttctacct ctctgtggag ggaggccgca ttgaccacgg tcaccatgac ggcaaagctt 1080

atatggcaact gactgaggcg atcatgtttg acaatgccat cgccaaggct aacgagctca 1140

45 ctagcgaact ggacacgctg atccttgtca ctgcagacca ctcccattgc ttctcttttg 1200

gtggctacac actgcgtggg acctccattt tcggtctggc ccccggaag gccttagaca 1260

gcaagtecta cacctccatc ctctatggca atggcccagg ctatgcgctt ggccggggct 1320

cgaggcccga tgttaatggc agcacaagcg aggaaccctc ataccggcag caggcgcccg 1380

tgcccctggc tagcgagacc caccggggcg aagacgtggc ggtgttcgcg cgaggcccg 1440

50 aggcgcacct ggtgcacggc gtgcaggagg agaccttcgt ggccgacatc atggcctttg 1500

cgggctgcgt ggagccctac accgactgca atctgccag ccccgccacc gccaccagca 1560

tccccgacgc cgcgcacctg gcggccagcc cgcctccact ggcgctgctg gctggggcga 1620

55

EP 0 955 369 A2

tgctgctgct gctggcgccc acctgtact aacccccacc agttccaggt ctccgggattt 1680  
 cccgctctcc tgcccaaaac ctcccagctc aggccctacc ggagctacca cctcagagtc 1740  
 cccaccccgga agtgcctatcc tagctgccac tcctgcagac ccgacccagc cggaattc 1798

<210> 2

<211> 480

<212> PRT

<213> Bovine intestinal

<400> 2

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala  
 20 25 30

Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr  
 35 40 45

Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly  
 50 55 60

Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser  
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val  
 100 105 110

Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu  
 115 120 125

Val Thr Ser Val Ile Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala Val Gly  
 130 135 140

Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr  
 145 150 155 160

Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala  
 165 170 175

Asp Ala Gln Lys Asn Gly Cys Gln Asp Ile Ala Ala Gln Leu Val Tyr  
 180 185 190

Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe  
 195 200 205

EP 0 955 369 A2

Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Ala Ser Val Asn  
210 215 220

5 Gly Val Arg Lys Asp Lys Gln Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys  
225 230 235 240

10 His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala  
245 250 255

Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala  
260 265 270

15 Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu  
275 280 285

20 Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg  
290 295 300

Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His  
305 310 315 320

25 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn  
325 330 335

Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile  
340 345 350

30 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr  
355 360 365

35 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp  
370 375 380

Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala  
385 390 395 400

40 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu  
405 410 415

45 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His  
420 425 430

Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu  
435 440 445

50 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe  
450 455 460

55

# EP 0 955 369 A2

Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala  
465 470 475 480

5

10

<210> 3  
<211> 2460  
<212> DNA  
<213> Bovine intestinal

15

<400> 3  
gaattcggca cgagcgagac ccagactccc caggtcccat cctgaccctc cgccatcaca 60  
cagctatgca gggggcctgc gtgctgctgc tgctgggctc gtggttacag ctctccctcg 120  
ccttcatccc agttgaggag gaagacccc ccttctggaa ccgccaggca gcccaggccc 180  
20 ttgatgtggc taagaagctg cagcccatcc agaaagccgc caagaatgtc atcctcttct 240  
tggaagatgg gatgggggtg cctacggtga cagccactcg gatactgaag gggcagatga 300  
atgacaagct gggacctgag acaccctgg ccatggacca gttcccatc gtggctctgt 360  
ccaagacata caacgtggac agacaggtgc cagacagcgc aggcactgcc actgcctacc 420  
tggtgtgggt caagggaac tacagaacca tcggtgtaag tgcagccgcc cgctacaatc 480  
25 agtgaacac gacacgtggg aatgaggtca cgtctgtgat gaaccgggcc aagaaagcag 540  
ggaagtcatg gggagtggg accaccacca gggcgagca cgcctcccca gccggtgctt 600  
atgcacacac ggtgaaccgt gactggtact cagacgcgca cctgcctgcc gatgcacaga 660  
cgtatggctg ccaggacatc gccacacaac tggtaacaa catggatatt gacgtgatcc 720  
30 tgggtggagg ccgaaagtac atgtttcctg aggggacccc agaccctgaa taccacacg 780  
atgccagtgt gaattggatc cgggaaggaca agcggaaatc ggtgcaggag tggcaggcca 840  
agcaccaggg agccagtat gtgtggaacc gcacggagct ccttcaggca gccaatgact 900  
ccagtgttac acatctcatg ggcctcttgc agccggcaga catgaagtat aatgttcagc 960  
aagacccac caaggacccg accctggagg agatgacgga ggcggccctg caagtgtgta 1020  
35 gcagggaacc ccagggttc tacctcttcg tggaggagg ccgcattgac caggtcacc 1080  
atgatagcaa agcttatatg gcgctgactg agcggtcat gtttgacaat gccatcgcca 1140  
aggctaacga gctcactagc gaactggaca cgtctgacct tgtaactgca gaccactccc 1200  
atgtcttctc ttttgggtgc tacacactgc gtgggacctc ctttttcggt ctggccccc 1260  
gcaaggcctc agacaagaag tctacacct ccatctcta tggcaatggc cctggctacg 1320  
40 tgcttggtg gggctcaagg cccgatgta atgacagcat aagcgaggac cctcatacc 1380  
ggcagcagg ggcctgccc ctgtctagcg agaccacgg gggcgaagac gtggcgggtg 1440  
tcgcgcagg cccgcaggcg cacctggtgc acggcgtgca ggaggagacc ttcgtggcgc 1500  
acgtcatggc ctttgcgggc tgcgtggagc cctacaccga ctgcaatctg ccggccccc 1560  
ctggcctctc cgacgcgcg cacttgccg ccagcgcgcc ttcgtagcg ctgctggcgc 1620  
45 gggcgatgct gctgctgctg gcgcccgcct tqtactgacc cccaccaact ccaggtcttg 1680  
gggtttcccg ctttcttgcc ccaaaatctc ccagcgcagg ccccatctga gctaccacct 1740  
cagagtcccc accctgaagt cctatctagc gactccaga ccgcgactca gcccaccac 1800  
cagagcttca cctcccagca acgaaggagc cttagctcac agcctttcat ggccagacc 1860  
50 attctggaga ctgagccct gattttcccg acccaacttc agtggttga gattttgtgt 1920  
tctgccacc cggtacctg taagggggtc cggaccatcc agactcccc cactgcccac 1980  
agccgaacct gaggaccagg ctggcacggt cccaggggtc ccaggcccgc ctggaacca 2040

55

EP 0 955 369 A2

catctttgcc ttccaggaga ccctgggact gtggggtttc caggaggcgt ggcttcttgg 2100  
 5 aggcgtggct tccgaggggt ggcttccgag aaggcgtggc tccctgtcct ggaaccaccc 2160  
 tgtgggnatc tggggcccaa ggagatgtct ggggcaaaga gtgcccgggg accctggaca 2220  
 cagaatcttc agcggccctt cctaggaacc cagcagtacc attatagaga ggggacaccg 2280  
 acacagagga gaggagactt gtcccaggtc cctcagctgc tgtgaggggt gacccttgg 2340  
 tcccgttacc aggcgtgggg atcccaggag caqcggggga cctgggggtg gggacacagg 2400  
 10 cccacacact ctgggagggg ggaagcagcc ctnaaataaa ctgttcctcg tgccgaattc 2460

<210> 4  
 <211> 511  
 <212> PRT  
 <213> Bovine intestinal

15 <400> 4  
 Phe Ile Pro Val Glu Glu Glu Asp Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala  
 1 5 10 15

20 Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Lys Ala  
 20 25 30

Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr  
 35 40 45

25 Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Asp Lys Leu Gly  
 50 55 60

30 Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser  
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala  
 85 90 95

35 Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val  
 100 105 110

40 Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu  
 115 120 125

Val Thr Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly  
 130 135 140

45 Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr  
 145 150 155 160

Ala His Thr Val Asn Arg Asp Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala  
 165 170 175

50 Asp Ala Gln Thr Tyr Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Val Asn

55

EP 0 955 369 A2

	180	185	190
5	Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe 195	200	205
10	Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro His Asp Ala Ser Val Asn 210	215	220
15	Gly Val Arg Lys Asp Lys Arg Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys 225	230	235 240
20	His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Leu Gln Ala 245	250	255
25	Ala Asn Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala 260	265	270
30	Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp Pro Thr Lys Asp Pro Thr Leu 275	280	285
35	Glu Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Gln 290	295	300
40	Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His 305	310	315 320
45	Asp Ser Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Val Met Phe Asp Asn 325	330	335
50	Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile 340	345	350
55	Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr 355	360	365
60	Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Ser Lys Ala Ser Asp 370	375	380
65	Lys Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val 385	390	395 400
70	Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Asp Ser Ile Ser Glu Asp 405	410	415
75	Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ser Ser Glu Thr His 420	425	430
80	Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu		

EP 0 955 369 A2

435 440 445

5 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Val Met Ala Phe  
450 455 460

Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ser  
465 470 475 480

10 Gly Leu Ser Asp Ala Ala His Leu Ala Ala Ser Ala Pro Ser Leu Ala  
485 490 495

15 Leu Leu Ala Gly Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Pro Ala Leu Tyr  
500 505 510

<210> 5  
20 <211> 2542  
<212> DNA  
<213> Bovine intestinal

<400> 5

25 gaattcggca cgaggagacc cggcctcccc aggtcccatc ctgaccctcc gccatcacac 60  
agccatgcag tgggcctgtg tgctgctgct gctgggcctg tggctacagc tctccctcac 120  
cttcatccca gctgaggagg aagaccocgc cttctggaac cgccaggcag cccaggccct 180  
tgatgtagcc aagaagtgc agccgatcca gacagctgcc aagaatgtca tcctcttctt 240  
gggggatggg atgggggtgc ctacgggtgac agccactcgg atcctaaagg ggcagatgaa 300  
30 tggtaagctg ggacctgaga caccctggc catggaccag tccccatacg tggctctgtc 360  
caagacatac aacgtggaca gacaggtgcc agacagcgca ggcactgcca ctgcctacct 420  
gtgtggggtc aaggggcaact acaaaacctat tgggtgaagt gcagccgccc gctacaacca 480  
gtgcaacaca acaagtggca atgaggtcac gtctgtgatg aaccgggcca agaaagcagg 540  
aaagtcatg ggagtggta ccacctccag ggtgcagcat gcctccccag ccggtgctta 600  
35 tgcacacacg gtgaaccgaa actggtactc agatgcgcag ctgcctgccg atgcacagac 660  
gtatggctgc caggacatcg ccacacaact ggtcaacaac atggatattg acgtgatcct 720  
gggtggaggc cgaatgtaca tgtttcctga ggggaccccg gatcctgaat acccatacga 780  
tgtcaatcag actggagtcc ggaaggacaa gcggaatctg gtgcaggagt ggcaggccaa 840  
40 gcaccaggga gccagtatg tgtggaaccg caggagctc cttcaggcag ccaatgacct 900  
cagtgtaca cacctcatgg gcctctttga gccggcagac atgaagtata atgttcagca 960  
agacccacc aaggaccgga ccctggagga gatgacggag gcggccctgc aagtgtgag 1020  
caggaacccc cagggttctt acctcttctg ggaggaggc cgcattgacc acggtcacca 1080  
tgaaggcaaa gcttatatgg cactgactga tacagtcatg tttgacaatg ccatcgccaa 1140  
45 ggctaacgag ctactagcg aactggacac gctgatcctt gccactgcag accactccca 1200  
tgtcttctct tttggtggct acacactgcg tgggacctcc attttcggtc tggcccccag 1260  
caaggcctca gacaacaagt cctacacctc catcctctat ggcaatggcc ctggctacgt 1320  
gcttgggtgg ggcttaaggc ccgatgttaa tgacagcata agcaggagacc cctcgtagcg 1380  
gcagcaggcg gccgtgcccc tgtctagtga gtcccacggg ggcgaggacg tggcggtgtt 1440  
50 cgcgcagggc ccgcaggcgc acctggtgca cggcgtgcag gaggagacct tcgtggcgca 1500  
cgtcatggcc tttgcgggct gcgtggagcc ctacaccgac tgcaatctgc cggccccctc 1560  
tggcctctcc gacgcgcgcg acctggcggc cagcccgctt tcgtggcgcg tgcgtggcgg 1620

55



EP 0 955 369 A2

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

ggcgatgctg ctgtctgctg cgcctgcctt gtactgaccc ccaccaactc caggtcttgg 1680  
 ggtttctctg tttctgcca aaaatctccc agcgcagacc ccaccagagc taccacctcg 1740  
 gagtctccac cctgaagtc tatcttagcg gccactcccg gatccccgac caggccccac 1800  
 tagcagagct tcacctccca gaaatgaagg attcaccttc cagcaacgaa gaagcctcag 1860  
 ctcacagccc ttcattggccc agcccatcca gaggtgagg ccctgatttc cctgtgacac 1920  
 ccgtagacct actgcccgcac cccaacttca gtggcttggg atttgtgtt ctgccacccc 1980  
 taaccccagt aagggggctc ggaccatcca gactctcccc actgcccaca accccacctg 2040  
 agaaccaggc tagcacggtc ccaaggttcc caggccccgc tagaaccac accatgcctt 2100  
 tcaggagacc ctggggctcc ggggtttccg ggaggcgtgg ctttcttagg aggcgtggaa 2160  
 actgaggagg cacggtttct gaggagcgt gcgtcctggg gagctgtggc ttccggctct 2220  
 ccccatgccc tgtgggctcc tccctaacca aggagacggc caaggagacg tctggaacca 2280  
 ggagcggcgg gggaaacctg cagagccctc agcaaccct cctaggaacc cagggtaccg 2340  
 ttagagagag gagacagcga cacagaggag aggagaactg tcccaggctc ctcagctgct 2400  
 atgaagggtg ccccggtgcc ccttcaggc tgggagatcc caggagcagc gggggagctg 2460  
 gtgggtggg acacagcccc gccttcattg gagggaggaa gcagccctca aataaactgt 2520  
 tctaagtgtg aaaaaatcta ga 2542

<210> 6  
 <211> 511  
 <212> PRT  
 <213> Bovine intestinal

<400> 6  
 Phe Ile Pro Ala Glu Glu Asp Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala  
 20 25 30  
 Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr  
 35 40 45  
 Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly  
 50 55 60  
 Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Lys Thr Ile Gly Val  
 100 105 110  
 Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Ser Gly Asn Glu  
 115 120 125  
 Val Thr Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly

EP 0 955 369 A2

	130	135	140
5	Val Val Thr Thr Ser Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr 145 150 155 160		
	Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala 165 170 175		
10	Asp Ala Gln Thr Tyr Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Val Asn 180 185 190		
15	Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe 195 200 205		
	Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Tyr Asp Val Asn Gln Thr 210 215 220		
20	Gly Val Arg Lys Asp Lys Arg Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys 225 230 235 240		
25	His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Leu Gln Ala 245 250 255		
	Ala Asn Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala 260 265 270		
30	Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp Pro Thr Lys Asp Pro Thr Leu 275 280 285		
35	Glu Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Gln 290 295 300		
	Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His 305 310 315 320		
40	Glu Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Asp Thr Val Met Phe Asp Asn 325 330 335		
	Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile 340 345 350		
45	Leu Ala Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr 355 360 365		
50	Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Ser Lys Ala Ser Asp 370 375 380		
55	Asn Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val		

EP 0 955 369 A2

	395	390	395	400
5	Leu Gly Gly Gly Leu Arg Pro Asp Val Asn Asp Ser Ile Ser Glu Asp	405	410	415
	Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ser Ser Glu Ser His	420	425	430
10	Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu	435	440	445
15	Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Val Met Ala Phe	450	455	460
	Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ser	465	470	475
20	Gly Leu Ser Asp Ala Ala His Leu Ala Ala Ser Pro Pro Ser Leu Ala	485	490	495
25	Leu Leu Ala Gly Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Pro Ala Leu Tyr	500	505	510
30	<210> 7 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence			
35	<220> <223> Description of Artificial Sequence: Artificial			
40	<400> 7 gcccaagaatg tcatacctc			
	<210> 8 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence			
45	<220> <223> Description of Artificial Sequence: Artificial			
50	<400> 8 gaggatgaca ttcttggc			
55	<210> 9 <211> 17			

18

18

EP 0 955 369 A2

5  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
10  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial  
  
17  
<400> 9  
ggtgtaagtg cagccgc  
  
15  
<210> 10  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
20  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial  
  
17  
<400> 10  
gcggctgcac ttagacc  
  
25  
<210> 11  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
30  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial  
  
17  
<400> 11  
aatgtacatg tttcctg  
  
35  
<210> 12  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
40  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial  
  
45  
<400> 12  
caggaaacat gtacatt  
  
50  
<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
55  
<220>

**EP 0 955 369 A2**

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

5                    <400> 13  
ccagggettc tacctctt                    18

10                   <210> 14  
                    <211> 18  
                    <212> DNA  
                    <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 14  
aagaggtaga agccctgg 18

20                   <210> 15  
                      <211> 18  
                      <212> DNA  
                      <213> Artificial Sequence

25                   <220>  
                    <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 15  
accagagcta ccacctcg 18

<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

40 <400> 16  
aagcaggaaa ccccaaga 18

45

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 17  
 cttcagtggc ttgggatt

EP 0 955 369 A2

5 <210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 18  
aatccaagc cactgaag 18

15 <210> 19  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

20 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 19  
cgaggctcgac ggtatcg 17

25 <210> 20  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

30 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

35 <400> 20  
gcaggtctct cagctgggat gagggtagg 30

40 <210> 21  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

45 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 21  
gcaggtctca gctgaggagg aaaaccccg 30

50 <210> 22  
<211> 27

55

EP 0 955 369 A2

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

5  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 22  
10 gcaggctctct gttgtgtcgc actggtt 27

<210> 23  
<211> 27  
<212> DNA  
15 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

20  
<400> 23  
ggtctcttttc ttggcccggt tgatcac 27

<210> 24  
25 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
30 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 24  
ggtctcaaga aagcagggaa ggccgctc 27

35  
<210> 25  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

40  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 25  
45 ggtctcgtgc atcagcaggc aggtcggc 28

<210> 26  
<211> 29  
<212> DNA  
50 <213> Artificial Sequence

<220>

55

**EP 0 955 369 A2**

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

5 <400> 26  
ggctctcatgc acagaagaat ggctgccag 29

10                   <210> 27  
                    <211> 30  
                    <212> DNA  
                    <213> Artificial Sequence

15                   <220>  
                    <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 27  
gggtctcaaac atgtacattc ggctccacc 30

20                   <210> 28  
                      <211> 27  
                      <212> DNA  
                      <213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 28  
gtctccatgt ttctgaggg gaccca 27

```

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

707-  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

40 <400> 29  
gggtctctgc cattctctgca ccagggtt 27

45                   <210> 30  
                    <211> 27  
                    <212> DNA  
                    <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 30  
gggtctctggc aggccaaagca ccaggga 27



EP 0 955 369 A2

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

<210> 31  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 31  
ggtctccagg gtcgggtcct tgggtgtg 27

<210> 32  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 32  
ggtctcgacc ctggcggaga tgacg 25

<210> 33  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 33  
ggtctcctca gtcagtgcca tata 24

<210> 34  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 34  
ggtctcactg aggcgatcat gtttgac 27

<210> 35  
<211> 23  
<212> DNA

EP 0 955 369 A2

<213> Artificial Sequence

5 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 35  
tgcaccaggt gcgcctgcgg gcc 23

10 <210> 36  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

20 <400> 36  
gccgcacagc tggctctaca catggat 27

<210> 37  
<211> 24  
25 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

30 <400> 37  
gctgtctaag gccttgccgg gggc 24

<210> 38  
35 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
40 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 38  
gccgcacagc tggctctaca catggat 27

45 <210> 39  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

55

EP 0 955 369 A2

<400> 39  
gggggtctcg cttgctgcc ttaac

25

<210> 40  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 40  
gttaatgggc tcacaagcga ggaaccctcg

30

<210> 41  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 41  
cccgtgggtc tcgctagcca ggggcac

27

<210> 42  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 42  
gttaatgggc tcacaagcga ggaaccctcg

30

<210> 43  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 43  
gatgctgggc tcggtggagg gggctggcag

30

EP 0 955 369 A2

5 <210> 44  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

10 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 44  
 ctgccaggtc tcaccaccgc caccagcatc 30

15 <210> 45  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

20 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 45  
 catacgatatt aggtgacact atag 24

25 <210> 46  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

30 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

35 <400> 46  
 ggtctctggc aggccaaagca ccaggga 27

40 <210> 47  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

45 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 47  
 gtagaagccc cgggggttcc tgct 24

50 <210> 48  
 <211> 24  
 <212> DNA

55

EP 0 955 369 A2

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 48

agcaggaacc cccggggctt ctac

24

<210> 49

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 49

tgccatataa gctttgccgt catggtg

27

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 50

ggtctctttt ttggcccggt tcatcac

27

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 51

tggtcaccac tcccacggac ttccctg

27

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

5 <400> 52  
gggtctcaaac atgtattttc ggctccacc 30

<210> 53  
<211> 30  
10 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
15 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 53  
gggtctcatgt ttctgtggg gacccagac 30

20 <210> 54  
<211> 27  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

30 <400> 54  
gggtctcctgc catgcctgca ccaggtt 27

# Patentansprüche

- 40 1. DNA kodierend eine eukaryontische hochaktive alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg, wobei der Aminosäurerest an der Position 322 kleiner ist als Aspartat.
2. DNA gemäß Anspruch 1, wobei der Aminosäurerest 322 Glycin, Alanin, Threonin, Valin oder Serin sein kann.
- 45 3. DNA gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der Aminosäurerest 322 Glycin oder Serin sein kann.
4. DNA gemäß einem der Ansprüche 1-3, wobei der Aminosäurerest 322 Glycin ist.
5. DNA gemäß SEQ ID No.: 1 (bIAP II).
- 50 6. DNA gemäß SEQ ID No.: 3 (bIAP III).
7. DNA gemäß SEQ ID No.: 5 (bIAP IV).
- 55 8. Verfahren zur Herstellung einer DNA gemäß einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß mutierte und Wildtyp-Fragmente der cDNA von einer oder mehreren alkalischen Phosphatasen zu einem Gen, das für eine aktive alkalische Phosphatase kodiert, ligiert wurden.

**EP 0 955 369 A2**

9. Eukaryontische cDNA, die funktionelle Isoenzyme mit alkalischer Phosphatase-Aktivität kodiert und die als Zwischenprodukt während eines Verfahrens gemäß Anspruch 8 entsteht.

10. Vektor enthaltend eine cDNA gemäß einem der Ansprüche 1-9.

11. Eukaryontische oder prokaryontische Zelle enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 10.

12. Hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase mit einer spezifischen Aktivität über 3000 U/mg, die kodiert wird durch eine DNA gemäß einem der Ansprüche 1-7.

13. Hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase gemäß Anspruch 12, wobei die Aminosäure in Position 322 Glycin ist.

14. Hochaktive rekombinante alkalische Phosphatase gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13, wobei zusätzlich in eine oder in mehrere der folgenden Aminosäurepositionen eine Mutation eingeführt wurde: 1, 108, 125, 149, 181, 188, 219, 221, 222, 223, 224, 231, 252, 258, 260, 282, 304, 321, 330, 331, 354, 383, 385, 400, 405, 413, 428, 431 und 461.

15. Verfahren zur Herstellung der hochaktiven alkalischen Phosphatase gemäß einem der Ansprüche 12-14, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA gemäß der Ansprüche 1 bis 11 verwendet wird.

16. Native hochaktive alkalische Phosphatase kodiert durch die SEQ ID No.: 4 (bIAP III) oder SEQ ID No.: 6 (bIAP IV).

Figur 1/1

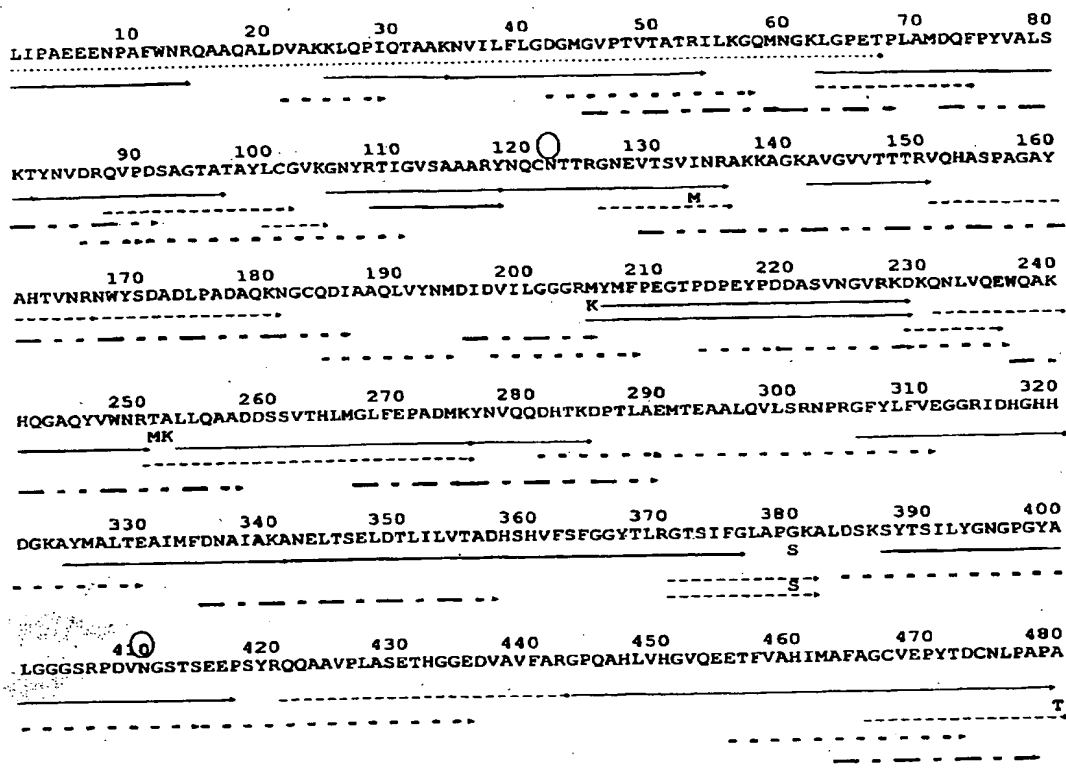
1 GAATTCGGCA CGAGCCAGGT CCCATCCTGA CCCTCCGCCA TCACACAGCT  
 51 ATGCAGTGGG CCTGTGTGCT GCTGCTGCTG GGCCTGTGGC TACAGCTCTC  
 101 CCTCACCCCTC ATCCCAGCTG AGGAGGAAAA CCCCGCCTTC TGAACCGCC  
 151 AGGCAGCCCA GGCCCTTGAT GTAGCCAAGA AGTTGCAGCC GATCCAGACA  
 201 GCTGCCAAGA ATGTCATCCT CTTCTTGGGG GATGGGATGG GGGTGCCTAC  
 251 GGTGACAGCC ACTCGGATCC TAAAGGGGCA GATGAATGGC AAACCTGGGAC  
 301 CTGAGACACC CCTGGCCATG GACCAGTTCC CATACTGGC TCTGTCCAAG  
 351 ACATACAACG TGGACAGACA GGTGCCAGAC AGCGCAGGCA CTGCCACTGC  
 401 CTACCTGTGT GGGGTCAAGG GCAACTACAG AACCATCGGT GTAAGTGCAG  
 451 CCGCCCGCTA CAATCAGTGC AACACGACAC GTGGGAATGA GGTCACGTCT  
 501 GTGATCAACC GGGCCAAGAA AGCAGGGAAG GCCGTGGGAG TGGTGACCAC  
 551 CACCAGGGTG CAGCATGCCT CCCAGCCGG GGCCTACGCG CACACGGTGA  
 601 ACCGAAACTG GTACTCAGAC GCCGACCTGC CTGCTGATGC ACAGAAGAAT  
 651 GGCTGCCAGG ACATCGCCGC ACAGCTGGTC TACAACATGG ATATTGACGT  
 701 GATCCTGGGT GGAGGCCGAA TGTACATGTT TCCTGAGGGG ACCCCAGACC  
 751 CTGAATACCC AGATGATGCC AGTGTGAATG GAGTCCGGAA GGACAAGCAG  
 801 AACCTGGTGC AGGAATGGCA GGCCAAGCAC CAGGGAGCCC AGTATGTGTG  
 851 GAACCGCACT GCGCTCCTTC AGGCGGCCGA TGAATCCAGT GTAACACACC  
 901 TCATGGGCCT CTTTGAGCCG GCAGACATGA AGTATAATGT TCAGCAAGAC  
 951 CACACCAAGG ACCCGACCCT GGCGGAGATG ACGGAGGCGG CCCTGCAAGT  
 1001 GCTGAGCAGG AACCCCGGG GCTTCTACCT CTTCTGTGGAG GGAGGCCGCA  
 1051 TTGACCACGG TCACCATGAC GGCAAAGCTT ATATGGCACT GACTGAGGCG  
 1101 ATCATGTTTG ACAATGCCAT CGCCAAGGCT AACGAGCTCA CTAGCGAACT  
 1151 GGACACGCTG ATCCTTGTCA CTGCAGACCA CTCCCATGTC TTCTCTTTTG  
 1201 GTGGCTACAC ACTGCGTGGG ACCTCCATTT TCGGTCTGGC CCCCAGCAAG



**Figur 2**  
**Figur 1/2**

1251 GCCTTAGACA GCAAGTCCTA CACCTCCATC CTCTATGGCA ATGGCCCAGG  
 1301 CTATGCGCTT GGCGGGGGCT CGAGGCCCCGA TGTTAATGGC AGCACAAGCG  
 1351 AGGAACCCTC ATACCGGCAG CAGGCGGCCG TGCCCCTGGC TAGCGAGACC  
 1401 CACGGGGGCG AAGACGTGGC GGTGTTTCGCG CGAGGCCCCG AGGCGCACCT  
 1451 GGTGCACGGC GTGCAGGAGG AGACCTTCGT GGCGCACATC ATGGCCTTTG  
 1501 CGGGCTGCGT GGAGCCCTAC ACCGACTGCA ATCTGCCAGC CCCC GCCACC  
 1551 GCCACCAGCA TCCCCGACGC CGCGCACCTG GCGGCCAGCC CGCCTCCACT  
 1601 GGCGCTGCTG GCTGGGGCGA TGCTGCTGCT GCTGGCGCCC ACCTTGTA  
 1651 AACCCCCACC AGTTCAGGT CTCGGGATTT CCCGCTCTCC TGCCCCAAAC  
 1701 CTCCCAGCTC AGGCCCTACC GGAGCTACCA CCTCAGAGTC CCCACCCCGA  
 1751 AGTGCTATCC TAGCTGCCAC TCCTGCAGAC CCGACCCAGC CGGAATTC

Figur 2



Figur 3/1

1 GAATTCGGCA CGAGCGAGAC CCAGACTCCC CAGGTCCCAT CCTGACCCTC  
 51 CGCCATCACA CAGCTATGCA GGGGGCCTGC GTGCTGCTGC TGCTGGGCCT  
 101 GTGGCTACAG CTCTCCCTCG CCTTCATCCC AGTTGAGGAG GAAGACCCCG  
 151 CCTTCTGGAA CCGCCAGGCA GCCCAGGCC TTTGATGTGGC TAAGAAGCTG  
 201 CAGCCCATCC AGAAAGCCGC CAAGAATGTC ATCCTCTTCT TGGGAGATGG  
 251 GATGGGGGTG CCTACGGTGA CAGCCACTCG GATACTGAAG GGGCAGATGA  
 301 ATGACAAGCT GGGACCTGAG ACACCCCTGG CCATGGACCA GTTCCCATAC  
 351 GTGGCTCTGT CCAAGACATA CAACGTGGAC AGACAGGTGC CAGACAGCGC  
 401 AGGCACTGCC ACTGCCTACC TGTGTGGGGT CAAGGGCAAC TACAGAACCA  
 451 TCGGTGTAAG TGCAGCCGCC CGCTACAATC AGTGCAACAC GACACGTGGG  
 501 AATGAGGTCA CGTCTGTGAT GAACCGGGCC AAGAAAGCAG GGAAGTCAGT  
 551 GGGAGTGGTG ACCACCACCA GGGTGCAGCA CGCCTCCCCA GCCGGTGTCT  
 601 ATGCACACAC GGTGAACCGT GACTGGTACT CAGACGCCGA CCTGCCTGCC  
 651 GATGCACAGA CGTATGGCTG CCAGGACATC GCCACACAAC TGGTCAACAA  
 701 CATGGATATT GACGTGATCC TGGGTGGAGG CCGAAAGTAC ATGTTTCCTG  
 751 AGGGGACCCC AGACCCTGAA TACCCACACG ATGCCAGTGT GAATGGAGTC  
 801 CGGAAGGACA AGCGGAATCT GGTGCAGGAG TGGCAGGCCA AGCACCAGGG  
 851 AGCCCAGTAT GTGTGGAACC GCACGGAGCT CCTTCAGGCA GCCAATGACT  
 901 CCAGTGTTAC ACATCTCATG GGCCTCTTTG AGCCGGCAGA CATGAAGTAT  
 951 AATGTTTCAGC AAGACCCAC CAAGGACCCG ACCCTGGAGG AGATGACGGA  
 1001 GCGGGCCCTG CAAGTGCTGA GCAGGAACCC CCAGGGCTTC TACCTCTTCG  
 1051 TGGAGGGAGG CCGCATTGAC CACGGTCACC ATGATAGCAA AGCTTATATG  
 1101 GCGCTGACTG AGGCGGTCAT GTTTGACAAT GCCATCGCCA AGGCTAACGA  
 1151 GCTCACTAGC GAACTGGACA CGCTGATCCT TGTCAGTGA GACCACTCCC  
 1201 ATGTCTTCTC TTTTGGTGGC TACACACTGC GTGGGACCTC CATTTTCGGT

Figur 3/2

1251 CTGGCCCCCA GCAAGGCCTC AGACAAGAAG TCCTACACCT CCATCCTCTA  
 1301 TGGCAATGGC CCTGGCTACG TGCTTGGTGG GGGCTCAAGG CCCGATGTTA  
 1351 ATGACAGCAT AAGCGAGGAC CCCTCATACC GGCAGCAGGC GGCCGTGCCC  
 1401 CTGTCTAGCG AGACCCACGG GGGCGAAGAC GTGGCGGTGT TCGCGCGAGG  
 1451 CCCGCAGGCG CACCTGGTGC ACGGCGTGCA GGAGGAGACC TTCGTGGCGC  
 1501 ACGTCATGGC CTTTGCGGGC TGCCTGGAGC CCTACACCGA CTGCAATCTG  
 1551 CCGGCCCCCT CTGGCCTCTC CGACGCCGCG CACCTGGCGG CCAGCGCGCC  
 1601 TTCGCTAGCG CTGCTGGCCG GGGCGATGCT GCTGCTGCTG GCGCCCGCCT  
 1651 TGTACTGACC CCCACCAACT CCAGGTCTTG GGGTTTCCCG CTTTCTTGCC  
 1701 CCAAATCTC CCAGCGCAGG CCCATCTGA GCTACCACCT CAGAGTCCCC  
 1751 ACCCTGAAGT CCTATCTAGC GCACTCCAGA CCGCGACTCA GCCCCACCAC  
 1801 CAGAGCTTCA CCTCCCAGCA ACGAAGGAGC CTTAGCTCAC AGCCTTTTCAT  
 1851 GGCCAGACC ATTCTGGAGA CTGAGGCCCT GATTTTCCCG ACCCAACTTC  
 1901 AGTGGCTTGA GATTTTGTGT TCTGCCACCC CGGATCCCTG TAAGGGGGCT  
 1951 CGGACCATCC AGACTCCCC CACTGCCAC AGCCGAACCT GAGGACCAGG  
 2001 CTGGCACGGT CCCAGGGGTC CCAGGCCCGG CTGGAACCCA CATCTTTGCC  
 2051 TTTCAGGAGA CCCTGGGACT GTGGGGTTTC CAGGAGGCGT GGCTTCTTGG  
 2101 AGGCGTGGCT TCGGAGGGGT GGCTTCCGAG AAGGCGTGGC TCCCTGTCCT  
 2151 GGAACCACCC TGTGGGNATC TGGGGCCCAA GGAGATGTCT GGGGCAAAGA  
 2201 GTGCCGGGGG ACCCTGGACA CAGAATCTTC AGCGGCCCT CCTAGGAACC  
 2251 CAGCAGTACC ATTATAGAGA GGGGACACCG ACACAGAGGA GAGGAGACTT  
 2301 GTCCCAGGTC CCTCAGCTGC TGTGAGGGGT GACCCTTGGT TCCCGTTACC  
 2351 AGGCTGGGGG ATCCCAGGAG CAGCGGGGGA CCTGGGGGTG GGGACACAGG  
 2401 CCCCACACTC CTGGGAGGGA GGAAGCAGCC CTNAAATAAA CTGTTCTCTG  
 2451 TGCCGAATTC

Figur 4

```

1  FIPVEEEDPA FWNRQAAQAL DVAKKLQPIQ KAAKNVILFL GDGMGVPTVT
51  ATRILKGQMN DKLGPETPLA MDQFPYVALS KTYNVDRQVP DSAGTATAYL
101 CGVKGNRYRTI GVSAAARYNQ CNTTRGNEVT SVMNRAKKAG KSVGVTTR
151 VQHASPAGAY AHTVNRDWYS DADLPADAQT YGCQDIATQL VNNMDIDVIL
201 GGGRKYMFPPE GTPDPEYPHD ASVNGVRKDK RNLVQEWQAK HQGAQYVWNR
251 TELLQAANDS SVTHLMGLFE PADMKYNVQQ DPTKDPTLEE MTEAALQVLS
301 RNPQGFYLFV EGGRIDHGHG DSKAYMALTE AVMFDNIAIAK ANELTSELDT
351 LILVTADHSH VFSFGGYTLR GTSIFGLAPS KASDKKSYTS ILYGNPGYV
401 LGGGSRPDVN DSISEDPSYR QQAAPVLSSE THGGEDVAVF ARGPPAHLVH
451 GVQEETFVAH VMAFAGCVEP YTDCNLPAPS GLSDAAHLAA SAPSLALLAG
501 AMLLLLAPAL Y

```

Figur 5/1

```

1  GAATTCGGCA CGAGGAGACC CGGCCTCCCC AGGTCCCATC CTGACCCTCC
51  GCCATCACAC AGCCATGCAG TGGGCCTGTG TGCTGCTGCT GCTGGGCCTG
101 TGGCTACAGC TCTCCCTCAC CTTTCATCCCA GCTGAGGAGG AAGACCCCGC
151 CTTCTGGAAC CGCCAGGCAG CCCAGGCCCT TGATGTAGCC AAGAAGTTGC
201 AGCCGATCCA GACAGCTGCC AAGAATGTCA TCCTCTTCTT GGGGGATGGG
251 ATGGGGGTGC CTACGGTGAC AGCCACTCGG ATCCTAAAGG GGCAGATGAA
301 TGGTAAGCTG GGACCTGAGA CACCCCTGGC CATGGACCAG TTCCCATACG
351 TGGCTCTGTC CAAGACATAC AACGTGGACA GACAGGTGCC AGACAGCGCA
401 GGCAGTCCA CTGCCTACCT GTGTGGGGTC AAGGGCAACT ACAAACCAT
451 TGGTGTAAGT GCAGCCGCCC GCTACAACCA GTGCAACACA ACAAGTGGCA
501 ATGAGGTCAC GTCTGTGATG AACCAGGGCCA AGAAAGCAGG AAAGTCAGTG
551 GGAGTGGTGA CCACCTCCAG GGTGCAGCAT GCCTCCCCAG CCGGTGCTTA
601 TGCACACACG GTGAACCGAA ACTGGTACTC AGATGCCGAC CTGCCTGCCG
651 ATGCACAGAC GTATGGCTGC CAGGACATCG CCACACAACCT GGTCAACAAC
701 ATGGATATTG ACGTGATCCT GGGTGGAGGC CGAATGTACA TGTTTCCTGA
751 GGGGACCCCG GATCCTGAAT ACCCATACGA TGTCAATCAG ACTGGAGTCC
801 GGAAGGACAA GCGGAATCTG GTGCAGGAGT GGCAGGCCAA GCACCAGGGA
851 GCCCAGTATG TGTGGAACCG CACGGAGCTC CTTAGGCAG CCAATGACCC
901 CAGTGTAACA CACCTCATGG GCCTCTTTGA GCCGGCAGAC ATGAAGTATA
951 ATGTTTACGA AGACCCACC AAGGACCCGA CCCTGGAGGA GATGACGGAG
1001 GCGGCCCTGC AAGTGCTGAG CAGGAACCCC CAGGGCTTCT ACCTCTTCGT
1051 GGAGGGAGGC CGCATTGACC ACGGTCACCA TGAAGGCAA GCTTATATGG
1101 CACTGACTGA TACAGTCATG TTTGACAATG CCATCGCCAA GGCTAACGAG
1151 CTCCTAGCG AACTGGACAC GCTGATCCTT GCCACTGCAG ACCACTCCCC
1201 TGTCTTCTCT TTTGGTGGCT ACACACTGCG TGGGACCTCC ATTTTCGGTC

```

Figur 5/2

1251 TGGCCCCCAG CAAGGCCTCA GACAACAAGT CCTACACCTC CATCCTCTAT  
 1301 GGCAATGGCC CTGGCTACGT GCTTGGTGGG GGCTTAAGGC CCGATGTTAA  
 1351 TGACAGCATA AGCGAGGACC CCTCGTACCG GCAGCAGGCG GCCGTGCCCC  
 1401 TGTCTAGTGA GTCCACGGG GGCGAGGACG TGGCGGTGTT CGCGCGAGGC  
 1451 CCGCAGGCGC ACCTGGTGCA CGGCGTGACG GAGGAGACCT TCGTGGCGCA  
 1501 CGTCATGGCC TTTGCGGGCT GCGTGGAGCC CTACACCGAC TGCAATCTGC  
 1551 CGGCCCCCTC TGGCCTCTCC GACGCCGCGC ACCTGGCGGC CAGCCCGCCT  
 1601 TCGCTGGCGC TGCTGGCCGG GGCGATGCTG CTGCTGCTGG CGCCTGCCTT  
 1651 GTACTGACCC CCACCAACTC CAGGTCTTGG GGTTCCTGC TTTCTGCCA  
 1701 AAAATCTCCC AGCGCAGACC CCACCAGAGC TACCACCTCG GAGTCTCCAC  
 1751 CCTGAAGTCC TATCTTAGCG GCCACTCCCG GATCCCCGAC CAGGCCCCAC  
 1801 TAGCAGAGCT TCACCTCCCA GAAATGAAGG ATTACCTTC CAGCAACGAA  
 1851 GAAGCCTCAG CTCACAGCCC TTCATGGCCC AGCCCATCCA GAGGCTGAGG  
 1901 CCCTGATTTC CCTGTGACAC CCGTAGACCT ACTGCCCGAC CCCAACTTCA  
 1951 GTGGCTTGGG ATTTTGTGTT CTGCCACCCC TAACCCAGT AAGGGGGCTC  
 2001 GGACCATCCA GACTCTCCCC ACTGCCCACA ACCCCACCTG AGAACCAGGC  
 2051 TAGCACGGTC CCAAGGTTCC CAGGCCCGGC TAGAACCAC ACCATGCCTT  
 2101 TCAGGAGACC CTGGGGCTCC GGGGTTTCCG GGAGGCGTGG CTTTCTTAGG  
 2151 AGGCGTGGAA ACTGAGGAGG CACGGTTTCT GAGGAGGCGT GCGTCCTGGG  
 2201 GAGCTGTGGC TTCCGGTCCT CCCCATGCCC TGTGGGCTCC TCCCTAACCA  
 2251 AGGAGACGGC CAAGGAGACG TCTGGAACCA GGAGCGGCGG GGGAACCTTG  
 2301 CAGAGCCCTC AGCAACCCCT CCTAGGAACC CAGGGTACCG TTAGAGAGAG  
 2351 GAGACAGCGA CACAGAGGAG AGGAGACTTG TCCCAGGTCT CTCAGCTGCT  
 2401 ATGAAGGTGG CCCCAGTGCC CCTTCCAGGC TGGGAGATCC CAGGAGCAGC  
 2451 GGGGGAGCTG GTGGGTGGGG ACACAGCCCC GCCTTCATGG GAGGGAGGAA  
 2501 GCAGCCCTCA AATAAACTGT TCTAAGTGTG AAAAAATCTA GA

Figur 6

1 FIPAEEDPA FWNRQAAQAL DVAKKLQPIQ TAAKNVILFL GDGMGVPTVT  
51 ATRILKGQMN GKLGPETPLA MDQFPYVALS KTYNVDRQVP DSAGTATAYL  
101 CGVKGNYKTI GVSAAARYNQ CNTTSGNEVT SVMNRAKKAG KSVGVTTSR  
151 VQHASPAGAY AHTVNRNWYS DADLPADAQT YGCQDIATQL VNNMDIDVIL  
201 GGGRMVMFPE GTPDPEYPYD VNQTGVRKDK RNLVQEWQAK HQGAQYVWNR  
251 TELLQAANDP SVTHLMGLFE PADMKYNVQQ DPTKDPTLEE MTEAALQVLS  
301 RNPQGFYLEV EGGRIDHGHG EGKAYMALTD TVMFDNAIAK ANELTSELDT  
351 LILATADHSH VFSFEGGYTLR GTSIFGLAPS KASDNKSYTS ILYGNGPGYV  
401 LGGGLRPDVN DSISEDPSYR QQAAVPLSSE SHGGEDVAVF ARGPQAHLVH  
451 GVQEETFVAH VMAFAGCVEP YTDCNLPAPS GLSDAAHLAA SPPSLALLAG  
501 AMLLLLAPAL Y



Figur 7

Residue #	1	2	4	8	31	61	108	122	125	133	142	149	167	180	181	188	192	205	210
blAPI I	L	V	V	V	D	T	G	R	K	R	M	S	T	N	M	A	Y	K	V
blAPI II	L	I	A	N	T	G	R	R	N	R	I	A	T	N	K	A	Y	M	E
blAPI III	F	I	V	D	K	D	R	R	N	R	M	S	T	D	T	Y	N	K	E
blAPI IV	F	I	A	D	T	G	K	N	N	S	M	S	S	N	T	Y	N	M	E

Residue #	219	221	222	223	224	231	236	252	258	260	282	289	294	297	299	304	321	322	330
blAPI I	D	A	S	V	N	Q	A	A	D	S	H	Q	V	R	V	R	D	D	E
blAPI II	D	A	S	V	N	Q	E	A	D	S	H	A	A	Q	L	R	D	G	E
blAPI III	H	A	S	V	N	R	E	E	N	S	P	E	A	Q	L	Q	D	S	E
blAPI IV	Y	V	N	Q	T	R	E	E	N	P	P	E	A	Q	L	Q	E	G	D

Residue #	331	332	354	380	383	385	400	405	411	413	416	420	427	428	431	453	461	480
blAPI I	A	G	V	S	L	S	A	S	D	T	D	Q	Q	Q	E	I	T	
blAPI II	A	I	V	G	L	S	A	S	G	T	E	R	L	A	T	Q	I	A
blAPI III	A	V	V	S	S	K	V	S	D	I	D	R	L	S	T	Q	V	S
blAPI IV	T	V	A	S	S	N	V	L	D	I	D	R	L	S	S	Q	V	S

Figur 8/1

## Ligation reactions to generate constructs

Construct	original bIAPs in fragment	PCR number (template)	Fragment Origin (PCR or cDNA)	Relevant residues in fragment	Restriction Enzymes	5' cohesive termini	3' cohesive termini
LIN8bIAP	IV	1 (IV)	KS - 1 L	1, 2, 4	EcoRI - BsaI	AATT	CAGC
	IV	2 (IV)	8N - 122	8, 31	Bsa I - BamHI	GCTG	GATC
	I		I	61, 149, 167, 181, 188, 219, 221, 222, 223, 224, 231, 252, 258, 260, 282, 383, 385, 400, 405, 413, 461	BamHI - XbaI	GATC	CTAG
INT1			pcDNA-3		XbaI - EcoRI	CTAG	AATT
	IV, I		LIN8bIAP		EcoRI - NcoI	AATT	CATG
	III	3 (III)	1s - M1331	108, 122, 125, 133	NcoI - BsaI	CATG	TTCT
	I	4 (I)	S142A - 180	142,	BsaI - BsaI	AGAA	TGCA
	I	5 (I)	M180K - K205M	180, 205	BsaI - BsaI	TGCA	AACA
	I	6 (I)	V210E - A236E	210, 236	BsaI - BsaI	TGTT	TGCC
	I	7 (I)	236 - 289		BsaI - BsaI	GGCA	GGGT
	IV	8 (IV)	E289A - 330	289, 294, 297, 299, 322	BsaI - BsaI	ACCC	TCAG
				330, 331, 332, 354	BsaI - StuI	CTGA	blunt
	III	9 (III)	E330, V332I - Xia		StuI - XbaI	blunt	CTAG
	I		I		XbaI - EcoRI	CTAG	AATT
			pcDNA-3				

Figur 8/2

INT2	IV,I,III,I,IV,III III I III III I I I	10 (INT1) 11 (INT1) 12 (III) 13 (INT1) 14 (INT1)	INT1 N192Y - S380G N192Y - D411G D416E - S428A III D416E - T480S 480 - SP6 I pcDNA-3	380 411 416, 428 431, 453 480	EcoRI - PstI PstI - StuI Sml - BsaI BsaI - BsaI BsaI - BsaI BsaI - BsaI BsaI - NotI NotI - EcoRI	AATT 3'ACGT5' blunt CTTG CTAG TCCT GTGG GGAT GGCC AATT	3'ACGT5' blunt CTTG CTAG TCCT GTGG GGAT GGCC AATT
INT3	IV,I,III,I III,I I I,IV IV,III,I,III,I	10 (INT1) INT2 N192Y - S380G INT2 INT2 pcDNA-3	INT2 INT2 N192Y - S380G INT2 INT2 pcDNA-3	192	EcoRI - NcoI NcoI - PvuII PvuII - EagI EagI - HindIII HindIII - XbaI XbaI - EcoRI	AATT CATG blunt GGCC AGCT CTAG AATT	CATG blunt GGCC AGCT CTAG AATT
biAP II	IV,I,III,I I,IV IV IV,III,I,III,I	15 (INT2) 16 (INT2) INT3 pcDNA-3	INT3 236 - Q304R- Q304R+ - E321D INT3 pcDNA-3	304 321	EcoRI - EagI EagI - SmaI SmaI - HindIII HindIII - XbaI XbaI - EcoRI	AATT GGCC blunt AGCT CTAG AATT	GGCC blunt AGCT CTAG AATT

Figur 9

AP mutant	$V_{\max} \pm \text{sd}$	$V_{\max} [\text{U/mg}]$	$T_{50} (10 \text{ min})$
<i>Wild-type</i>			
bIAP I	$5.26 \pm 0.44$	$2.723 \pm 249$	66,2
bIAP II	$16.61 \pm 0.88$	$8.600 \pm 843$	58,8
bIAP III	$9.07 \pm 0.79$	$4.696 \pm 494$	59,1
bIAP IV	$13.11 \pm 0.85$	$6.787 \pm 571$	52,9
<i>Chimaeric</i>			
L1N8	$5.90 \pm 0.40$	$3.055 \pm 336$	65,8
INT 1	$19.22 \pm 1.08$	$9.951 \pm 1.565$	59,7
INT 2	$16.95 \pm 0.95$	$8.776 \pm 1.431$	55,6
INT 3	$17.17 \pm 0.90$	$8.890 \pm 1.413$	57,9
<i>Mutants</i>			
[K <sup>122</sup> ]bIAP II	$16.21 \pm 2.33$	$8.393 \pm 1.328$	58,0
[M <sup>133</sup> ]bIAP II	$17.69 \pm 1.45$	$9.159 \pm 1.099$	58,1
[S <sup>142</sup> ]bIAP II	$16.53 \pm 1.06$	$8.559 \pm 603$	57,9
[M <sup>180</sup> ]bIAP II	$17.81 \pm 0.80$	$10.433 \pm 900$	58,6
[K <sup>205</sup> ]bIAP II	$20.29 \pm 1.25$	$9.454 \pm 819$	57,5
[V <sup>210</sup> ]bIAP II	$17.98 \pm 1.40$	$8.377 \pm 908$	58,1
[A <sup>238</sup> ]bIAP II	$19.61 \pm 2.81$	$10.153 \pm 1.565$	58,1
*[QVRV]bIAP II	$19.25 \pm 0.99$	$9.967 \pm 534$	59,0
[D <sup>322</sup> ]bIAP II	$5.44 \pm 0.34$	$2.817 \pm 307$	61,4
[G <sup>332</sup> ]bIAP II	$16.53 \pm 1.30$	$8.559 \pm 1.075$	59,2
[G <sup>322</sup> ]bIAP I	$19.60 \pm 0.99$	$10.148 \pm 1.021$	60,6